

Enginyeria genètica en *Deinococcus radiodurans* per bioprecipitar urani en residus radioactius

Ramírez, D.

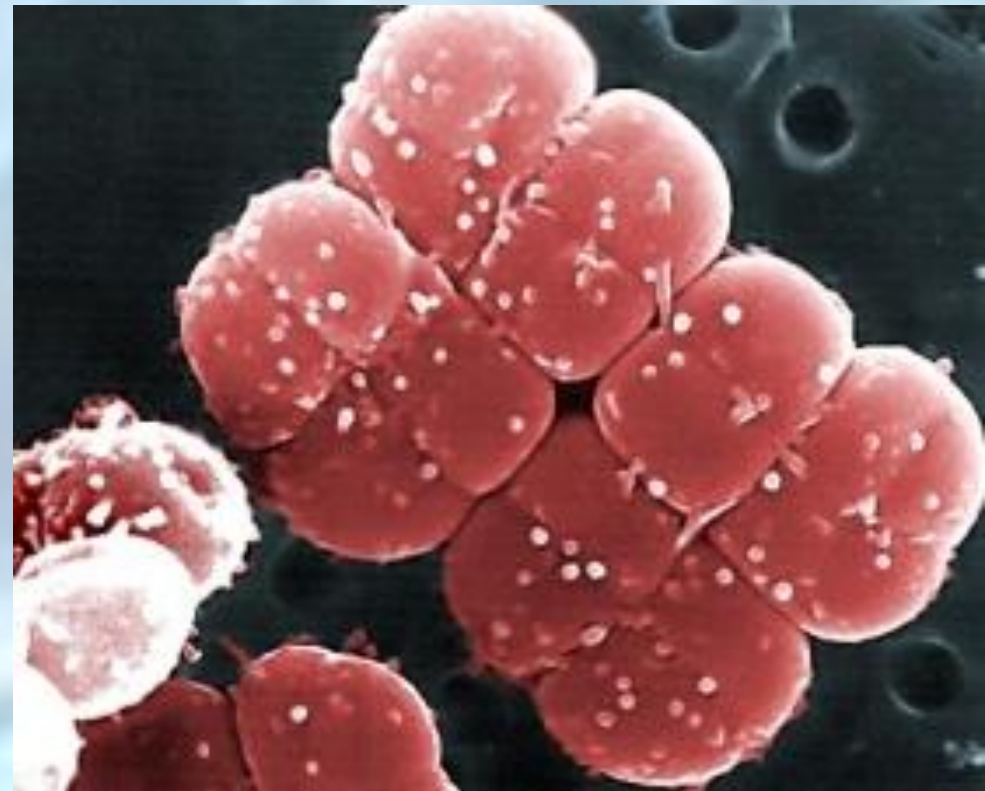
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Daniel.ramirezca@gmail.com



Introducció

Deinococcus radiodurans és un dels organismes que afronta millor l'estrès oxidatiu que afecta als components cel·lulars. Aquest estrès oxidatiu es causat per l'acumulació de les espècies reactives de l'oxigen (ROS), les quals poden ser generades pel propi metabolisme o poden generar-se a través d'una exposició física o química com la dessecació, la radiació ionitzant, la radiació UV, el peròxid d'hidrogen, la mitomicina, entre d'altres. Les causes d'aquesta acumulació de ROS són un dany en molts components cel·lulars com proteïnes, lípids, àcids nucleics i carbohidrats. L'enginyeria genètica sobre organismes resistents a la radiació com *D. radiodurans* per bioremediar metalls pesants o radionucleòtids en restes nuclears es presenta com una bona alternativa als tractaments físico-químics que es duen a terme actualment. De totes les tècniques de bioprecipitació de l'urani s'ha observat que la millor opció és la bioprecipitació utilitzant fosfatases. Aquestes, a través de diferents substrats, generen fosfats inorgànics que formen complexos inorgànics amb l'urani i precipiten.



Deinococcus radiodurans

D. radiodurans és 30 i 1000 vegades més resistent a la radiació ionitzant que *Escherichia coli* i els humans, respectivament. Pot reparar 200 trencaments de doble cadena (DSB) i 190 entrecruaments per copia de genoma sense perdre viabilitat. Tot això ho podem observar a la figura 1, on es veu que la viabilitat de *D. radiodurans* és molt més elevada que la de *E. coli* un cop exposats a diferents agents químics i físics causants de danys al DNA o provocant la formació de ROS.

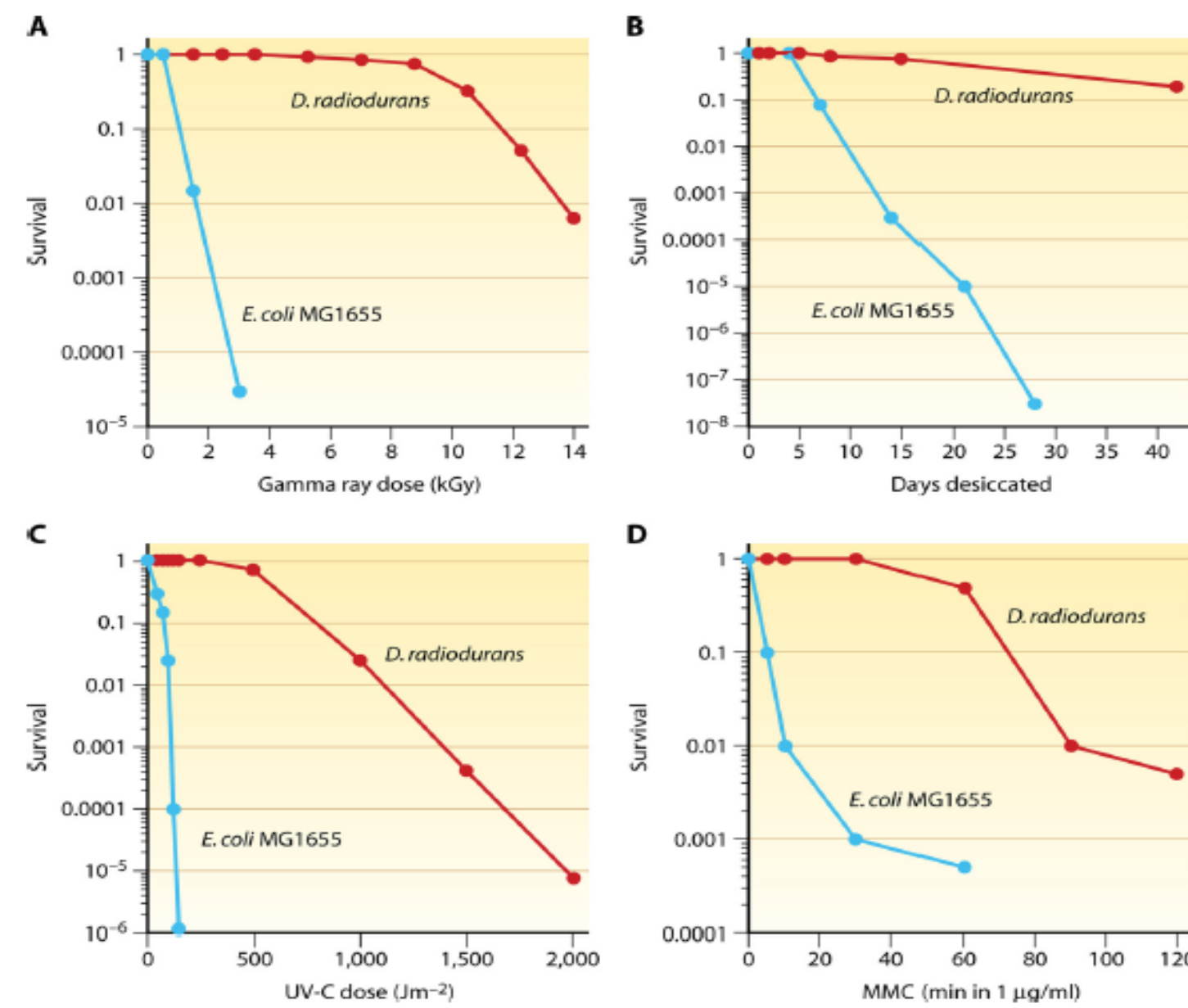
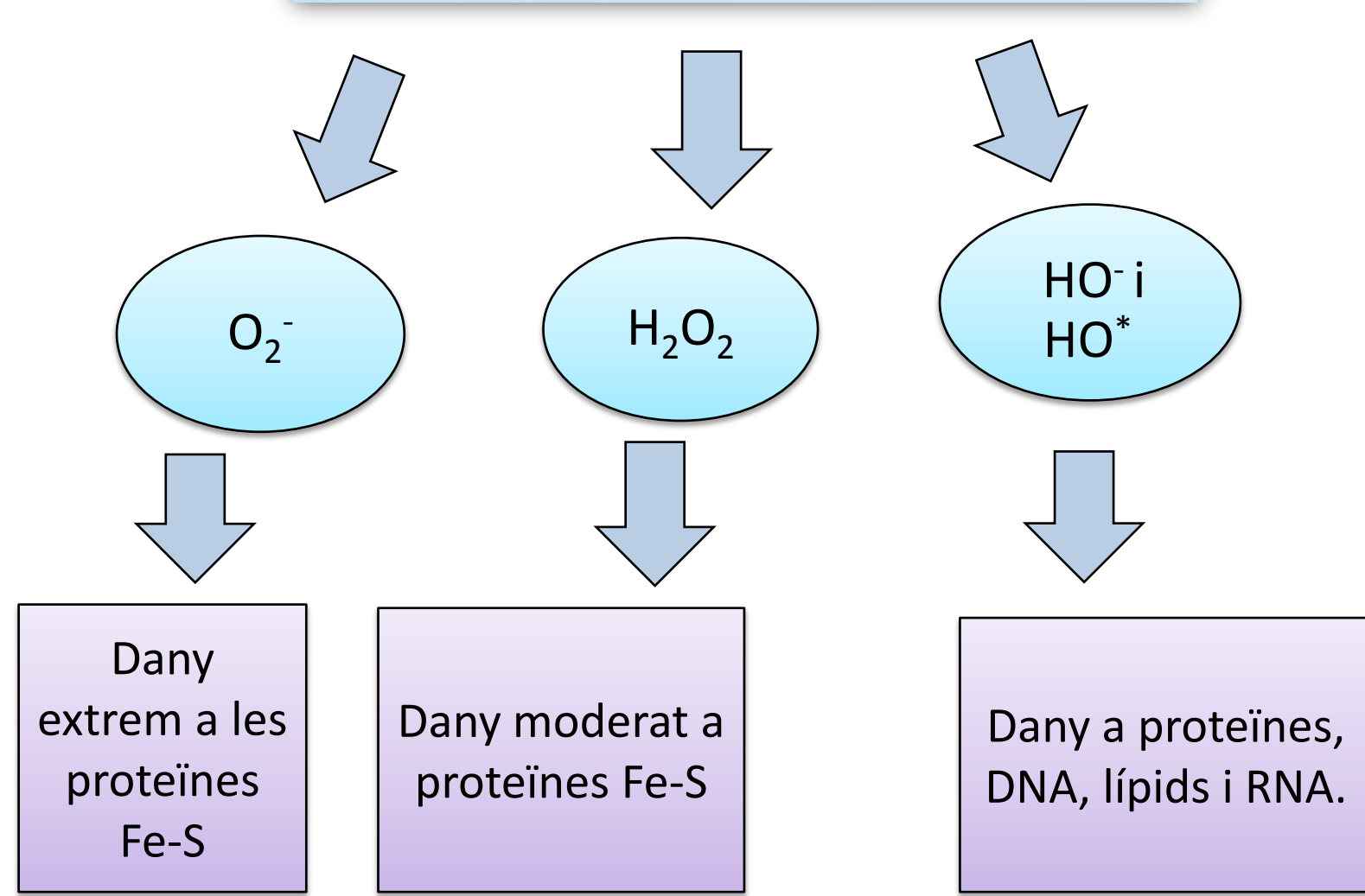
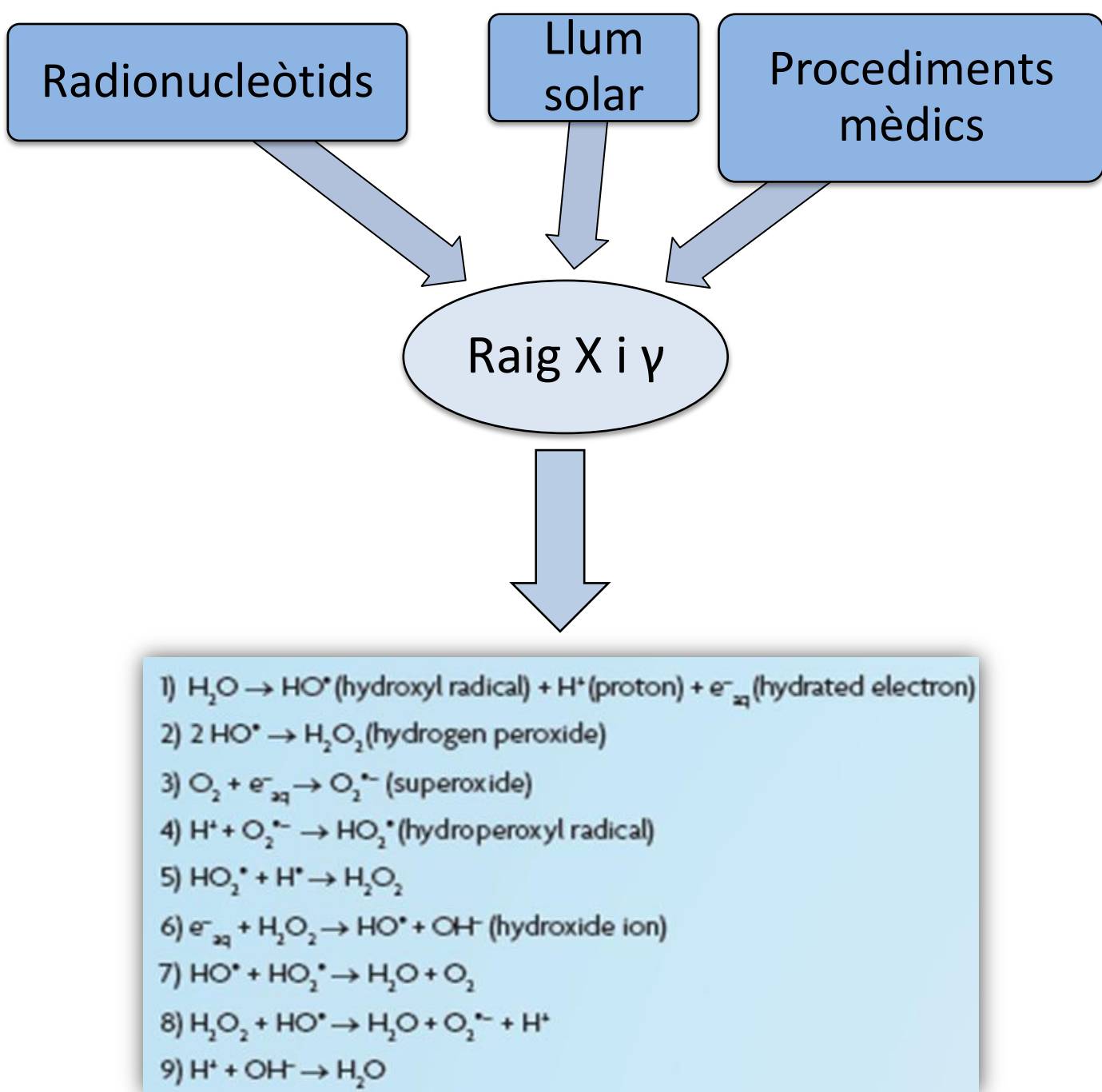


Figura 1. Supervivència de *D. radiodurans* i *E. coli* exposats a la radiació gamma (A), a la dessecació (B), a la radiació UV (C) i a la micomicina (D).



Alliberació del Fe²⁺

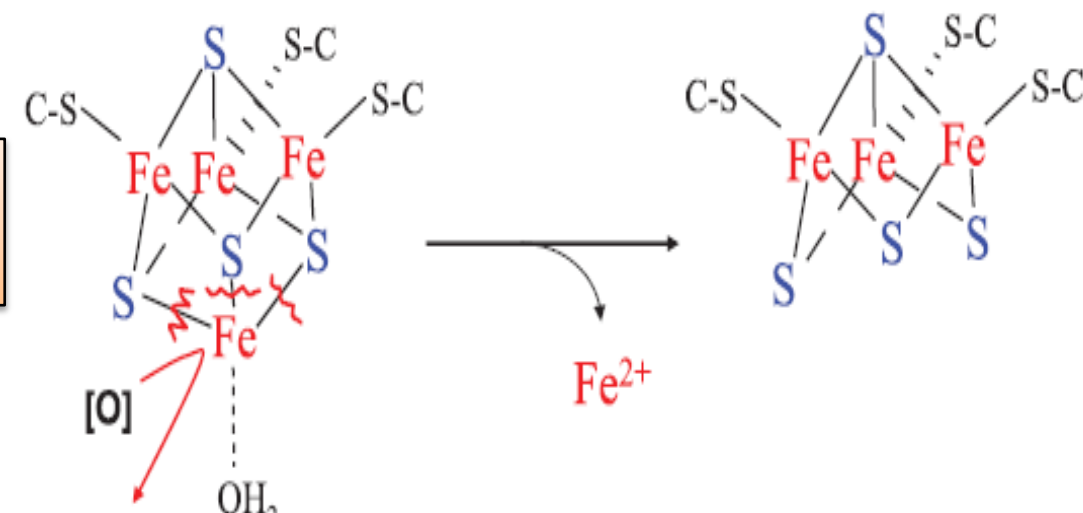


Figura 3. Inactivació del grup [4Fe-4S]²⁺ per oxidació. Una espècie ROS representada en aquest cas com [O], oxida el grup i passa a la seva forma inestable [4Fe-4S]³⁺. Posteriorment, i de manera espontània, s'alliberarà un ferro i el grup passarà al seu estat d'oxidació +1, el qual deixarà a l'enzim inactiu.

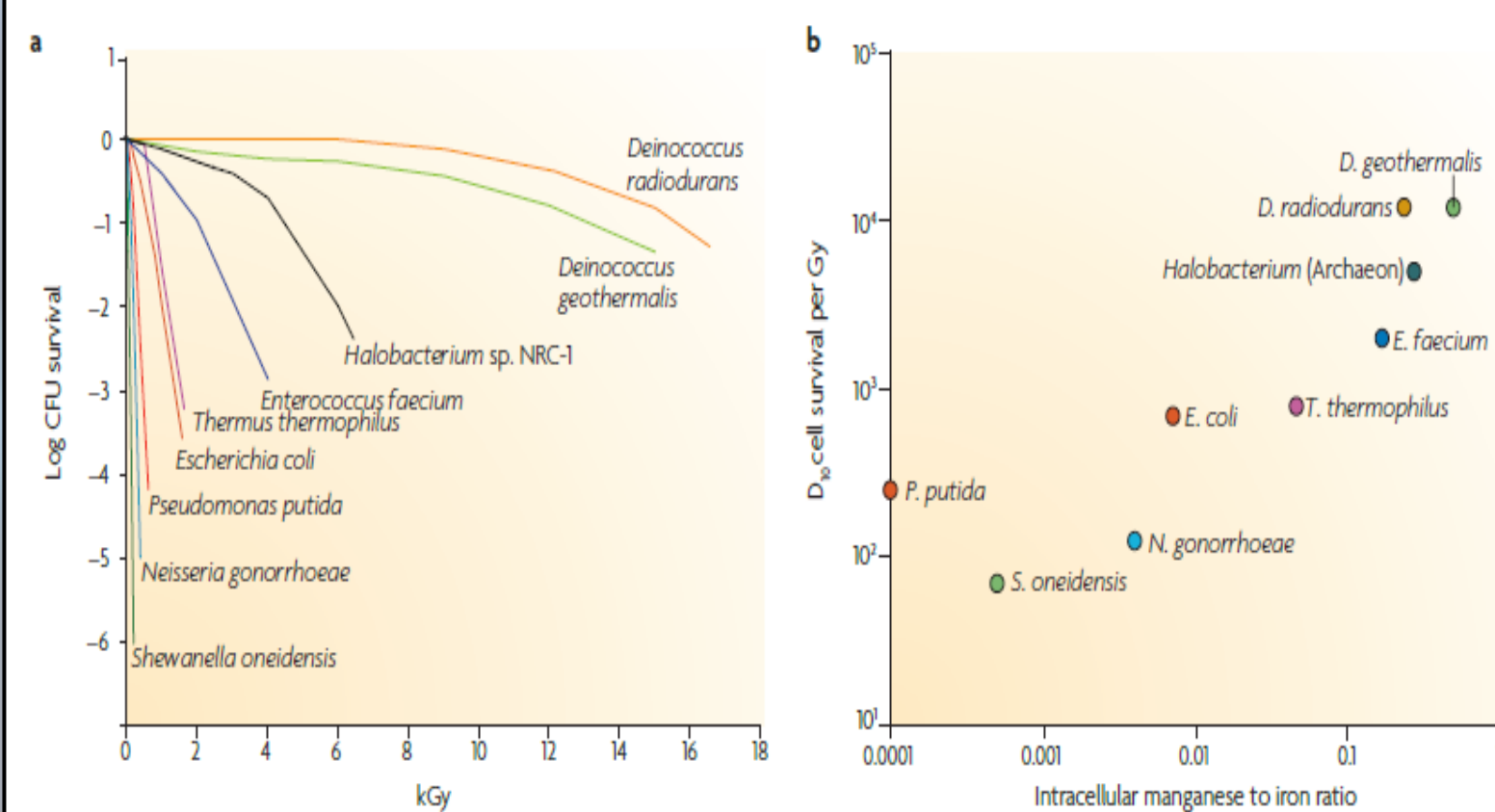


Figura 2. (a) Resistències de diferents organismes per sobreviure a diferents dosis de radiació. (b) Quantitat de manganès per ió de ferro d'aquests mateixos organismes, en front de la seva capacitat per sobreviure a la radiació.

Com veiem, hi ha una relació directa entre la quantitat de manganès per ió de ferro que té un organisme i la capacitat que té aquest organisme per sobreviure a la radiació. La família del *Deinococcus*, és la que conté les quantitats més elevades de manganès i la que presenten una resistència més elevada. Per altra banda, les famílies de *Shewanella*, *Neisseria* i *Pseudomonas* són els organismes amb menys manganès intracel·lular, i amb menys capacitat per sobreviure a la radiació.

Conclusions

- D. radiodurans* és un bon organisme model per aplicacions en ambients radioactius gràcies a les capacitats que té per sobreviure-hi en aquestes condicions.
- L'organisme presenta uns bons resultats a l'hora de bioprecipitar l'urani en residus radioactius.
- Queda molta feina per fer, ja que només s'han fet proves a escala laboratori, no s'ha arribat a escala pilot o a fer-ho en un cas real. A més, aquestes proves

Enginyeria genètica

En aquest apartat ens centrarem en la construcció d'una soca mutant de *D. radiodurans* per bioprecipitar l'urani amb la incorporació del gen *phoN*, que codifica per una fosfatasa àcida. Es construeixen 2 mutants, un amb el plàsmid pRAD1, que només conté el gen, i l'altre el pPN1 el qual a més conté el promotor *groESL* per sobreexpressar la proteïna. Primer de tot s'observa que hi hagués una sobreexpressió correcta d'aquesta proteïna a través d'un zymograma, i que aquesta sobreexpressió no afectes a la supervivència de l'organisme. Finalment es va fer un assaig per veure la quantitat d'urani que podia precipitar.

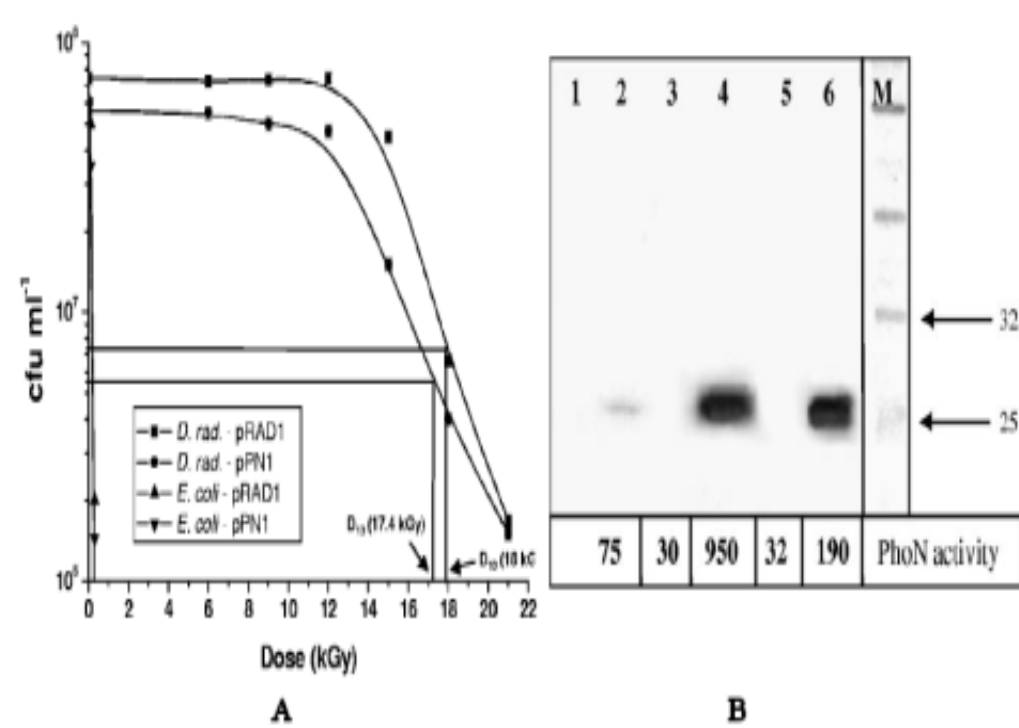


Figura 5. (A) Evolució de les CFU per mL exposades a diferents dosis de radiació creixent. (B) Zymograma de la fosfatasa àcida.

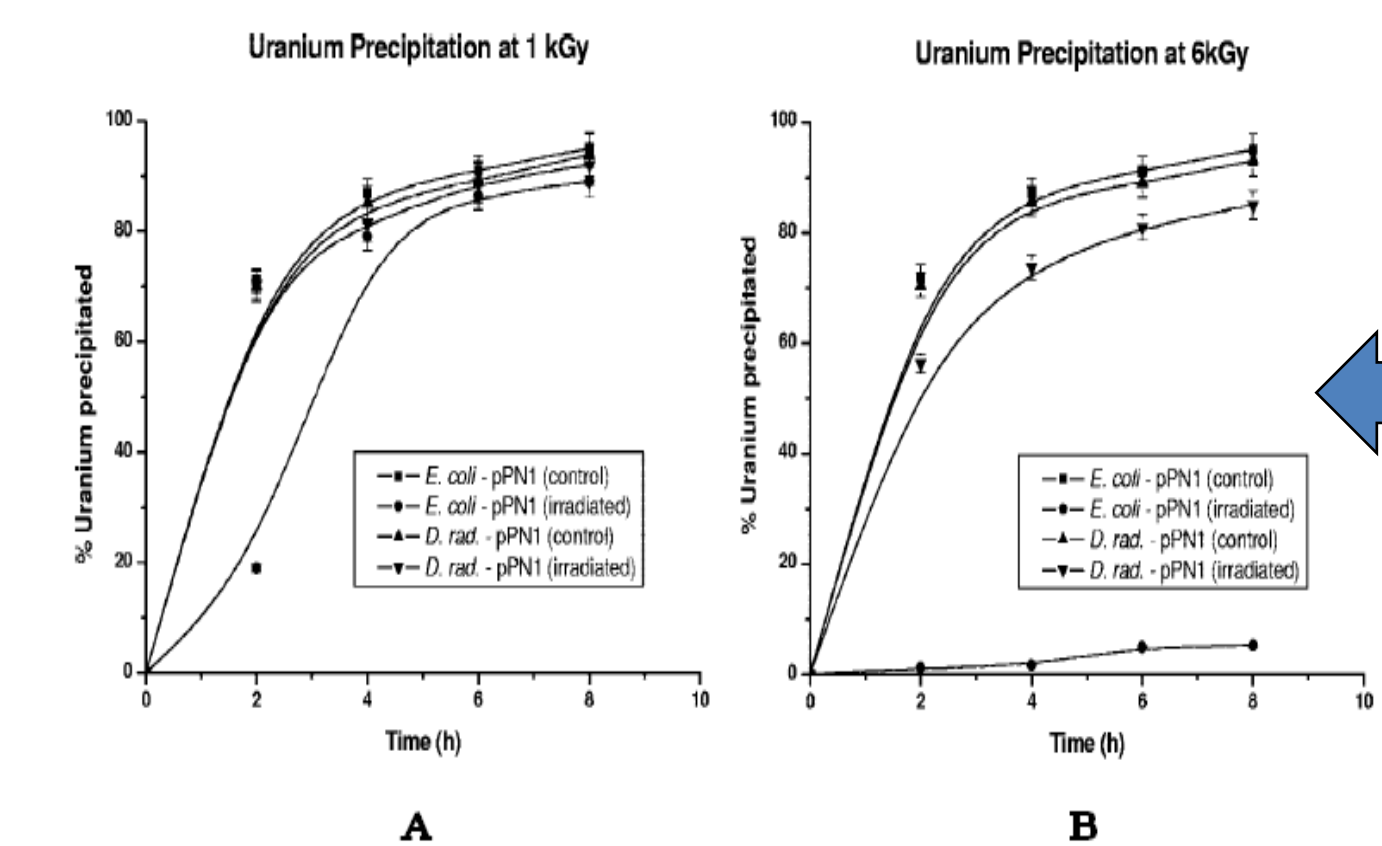


Figura 6. % d'urani precipitat en front a diferents dosis de radiació, 1 kGy (A) i 6 kGy (B).

Correcte sobreexpressió
No afecta a la supervivència
>90% urani precipitat a 6kGy

Proposta cas real

En aquest apartat es proposa la utilització d'aquesta metodologia en una etapa del procés de tractament de residus líquids nuclears. En aquest cas es substitueix la precipitació química que s'utilitza actualment a través de compostos químics com el sulfat de sodi, clorur de bari, ferrocianur de potassi, sulfat de coure, entre d'altres, per una bioprecipitació amb el nostre organisme model.

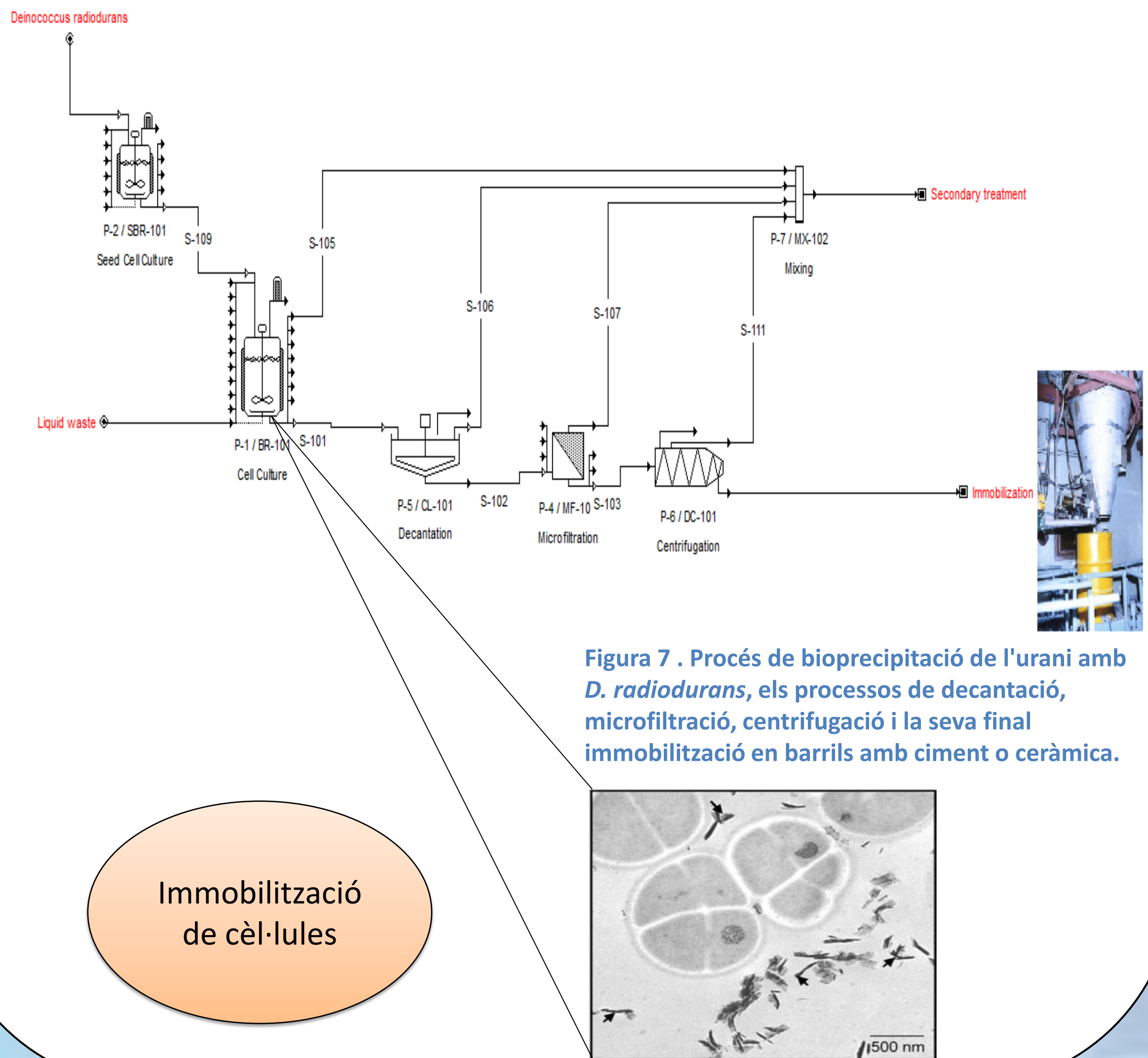


Figura 7. Procés de bioprecipitació de l'urani amb *D. radiodurans*, els processos de decantació, microfiltració, centrifugació i la seva final immobilització en barrils amb ciment o ceràmica.

Referències

- [1] Appukuttan, D., Sambasiva, A. & Kumar, S. (2006). Engineering of *Deinococcus radiodurans* R1 for Bioprecipitation of Uranium from Dilute Nuclear Waste. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 72, 7873-7878. DOI: 10.1016.
- [2] Slade, D. & Radman, M. (2011). Oxidative Stress Resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 75, 133-191.
- [3] Raj, K., Prasad, K. & Bansal, N. (2006). Radioactive waste management practices in India. *Nuclear Engineering and Design* 236, 914-930.
- [4] Daly, M. (2009). A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nature reviews*, 7, 237-245.